

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian dilakukan adalah eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena observasi di bawah kondisi buatan (*artificial condition*) dimana kondisi tersebut dibuat dan diatur. Penelitian ini dilakukan dengan mengadakan manipulasi objek penelitian serta adanya kontrol sebagai suatu perbandingan dalam eksperimen (Nazir, 2003:63).

B. Desain Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL), desain ini biasa digunakan jika percobaan bersifat homogen seperti percobaan dalam laboratorium atau rumah kaca (Nazir, 2003 :235). Penelitian ini terdiri dari lima perlakuan dengan menggunakan berbagai konsentrasi ekstrak rimpang kunyit, DMSO 1% dan akuades steril sebagai kontrol negatif dan fungisida Dithane M-45 0,2% sebagai kontrol positif (Haris *et al.*, 2004). Konsentrasi ekstrak minimum yang dipakai pada penelitian ini berdasarkan konsentrasi efektif penghambatan tertinggi secara *in vitro* yang telah dilakukan sebelumnya yaitu: 0,04%, 0,08%, 0,12%, 0,16% dan 0,20% (b/v) (Astuti, 2009). Pada penelitian ini terdapat dua variabel penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak rimpang kunyit yang dipakai

sedangkan variabel terikatnya ialah perkecambahan, kejadian penyakit, tingkat keparahan penyakit serta kematian tanaman.

Objek pada penelitian ini adalah efektivitas ekstrak rimpang kunyit terhadap patogenesis jamur *F. oxysporum* pada benih cabai. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah patogenesis jamur *F.oxysporum* pada benih cabai tanpa perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit atau perlakuan dengan akuades steril dan Dimetil Sulfoksida (DMSO) 1%. Kontrol positif dalam penelitian ini adalah patogenesis jamur *F. oxysporum* pada benih cabai tanpa perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit atau perlakuan dengan fungisida Dithane M-45 0,2% (mengandung Mancozeb 80%).

Setiap perlakuan dalam penelitian ini mendapatkan pengulangan yang diperoleh dari rumus pengulangan RAL sebagai berikut (Gomez dan Gomez, 1995)

$$T(r) \geq 20$$

$$8(r) \geq 20$$

$$8r \geq 20$$

$$8r \geq 20$$

$$r \geq 2,5 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

T : Jumlah perlakuan

r : Jumlah pengulangan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan adalah kurang lebih atau sama dengan tiga kali. Jumlah kelompok percobaan atau plot disusun secara acak, berikut adalah penempatan perlakuan setelah dilakukan randomisasi :

Tabel 3.1 Desain Rancangan Acak Lengkap

A3	E3	G2	H4	A2	D1	C2	E4
B4	H3	B1	G4	D2	C1	B3	F3
G3	F4	E2	D3	A1	H2	F2	C3
H4	B2	C4	G1	E1	F1	A4	H1

Keterangan :

A: Kontrol negatif (akuades teril)

B: Kontrol negatif (DMSO 1 %)

C : Kontrol positif (Dithane M-45 0,2%)

D : Konsentrasi ekstrak 0,04%

E : Konsentrasi ekstrak 0,06%

F: Konsentrasi ekstrak 0,08%

G : Konsentrasi ekstrak 0,1%

H : Konsentrasi ekstrak 0,12%

C. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh spora jamur *F. oxysporum* yang diambil dari biakan murni *F.oxysporum*. Sedangkan sampel pada penelitian ini adalah spora jamur *F.oxysporum* pada benih cabai yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak rimpang kunyit (*C. domestica* Val.)

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian berlangsung dari bulan April sampai dengan Juli 2010 di laboratorium mikrobiologi serta rumah kaca Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum dalam Tabel 3.2 dan 3.3

Tabel 3.2 Alat yang digunakan

No	Nama alat	Jumlah	Spesifikasi
1	Alumunium foil	1 gulung	25 sq.ft (7,6 m x 30 cm)
2	Autoklaf	1 buah	Merek EYELE
3	Batang pengaduk	1 buah	Berbahan gelas
4	Beaker glass	@1 buah	Gelas pyrex ukuran 1000 ml dan 500 ml
5	Blender	1 buah	Merk National
6	Baki	2 buah	Berbahan plastik
7	Cawan Petri	10 buah	Tahan panas
8	Gelas objek dan gelas penutup	2 buah	
9	<i>Haemocytometer</i>	1 buah	0,100 mm tiefe depth profondeur
10	Jarum inokulasi	1 buah	Panjang 15 cm
11	Kain kassa	Secukupnya	Steril
12	Kapas	Secukupnya	
13	Kertas saring		Whatman No. 1
14	Labu Erlenmeyer	5 buah	Tahan panas
15	Lampu spirtus	2 buah	
16	Magnetic stirrer	1 buah	Model RCH-3
17	Makropipet	1 buah	Kapasitas 5 ml dan 10 ml
18	Mikroskop	1 buah	1000 x perbesaran
19	Neraca digital	1 buah	Merek AND ketelitian 0,001 mg
20	Pisau	1 buah	Tajam
21	Polibag	50 buah	Ukuran 20 x 35 cm
22	Rak tabung	1 buah	

23	<i>Sprayer</i>	1 buah	
24	<i>Shaker</i>	1 buah	Eyela Multi Shaker MMS
25	Sekop	1 buah	Ukuran kecil
27	<i>Trash bag</i>	1 buah	

Tabel 3.3 Bahan yang digunakan

No	Nama bahan	Jumlah	Spesifikasi
1	Agar-agar	15 gram	Difco agar
2	Akuades steril	2000 ml	Disterilkan dengan autoklaf
3	Benih cabai merah	1 bungkus	
4	Dithane M-45	2 gram	Mengandung 80% Mancozeb
5	DMSO	1000 ml	Konsentrasi 1%
6	Ethanol	3500 ml	Konsentrasi 96% dan 70%
7	Jamur <i>F. oxysporum</i>	1 stok kultur	Koleksi BALITSA
8	Kunyit	7 kg	Diperoleh dari petani di daerah Padalarang
9	Kentang	200 gram	
10	NaCl	5 gram	Teknis
11	Sukrosa	200 gram	Teknis
12	Tanah steril	25 kg	Tanah lembang, disterilkan dengan autoklaf

F. Prosedur Kerja

1. Tahap persiapan

a. Pembuatan Medium PSA

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan jamur adalah medium PSA (Potato Sukrosa Agar). Pembuatan medium PSA adalah sebagai berikut : kentang sebanyak 200 gram dipotong kecil-kecil kemudian direbus dalam 1000 ml akuades, setelah kentang empuk kemudian disaring sehingga didapatkan ekstrak kentang. Ekstrak kentang kemudian dilarutkan dalam akuades sampai volumenya 1000 ml, selanjutnya ditambahkan 20 gram sukrosa dan 15 gram agar-agar kemudian diaduk dan dipanaskan dengan menggunakan *magnetic stirrer with hot plate* selama 20 menit. Setelah mendidih medium diangkat dan diukur pH nya dengan menggunakan pH meter dan ditambahkan HCl 1 M atau NaOH 1M sampai pH medium mencapai 5,6 kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (Gandjar *et al.*, 1999:134).

b. Sterilisasi

Semua alat gelas tahan panas, bahan dan media yang tidak akan rusak jika terkena panas disterilkan dengan autoklaf. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan uap air bertekanan tinggi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Alat-alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan alkohol.

2. Tahap Pra Penelitian

a. Identifikasi Jamur

Identifikasi jamur *F. oxysporum* dilakukan melalui pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati warna dan bentuk koloni jamur *F. oxysporum*. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati struktur konidia, bentuk spora dan hifa jamur *F. oxysporum* dengan menggunakan metode *slide culture* secara aseptik. Adapun prosedur dalam pembuatan *slide culture* yaitu, cawan Petri untuk *slide culture* steril berisi kain kasa, sumpit kayu yang dibentuk segitiga, satu buah kaca objek dan dua buah kaca penutup. Medium PSA steril sebanyak 5 ml dicairkan kemudian dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Selanjutnya setelah medium PSA membeku, dibuat kotak agar dengan ukuran 3x3 mm kemudian disimpan di atas kaca objek. Setelah itu, miselium jamur *F. oxysporum* ditanamkan di atas kotak agar dengan menggunakan lup inokulasi dan ditutup dengan kaca penutup (Heritage, 1996:145). Jamur ditumbuhkan selama satu minggu dengan kondisi lembab, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop.

b. Pemeliharaan dan penyediaan Jamur

Sebelum dilakukan pengujian, jamur yang akan digunakan dimudakan terlebih dahulu di dalam medium PSA. Proses dari pemuasaan jamur adalah sebagai berikut: biakan jamur diinokulasikan pada medium PSA dalam cawan Petri dan diinkubasikan pada suhu

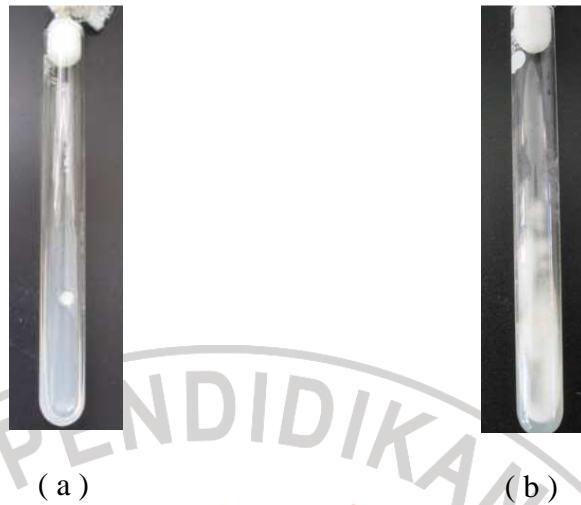
ruang selama tujuh hari selanjutnya disimpan pada suhu 4°C. Kultur jamur *F. oxysporum* usia lima hari ditunjukkan di Gambar 3.1



Gambar 3.1 Kultur Jamur *F. oxysporum* usia lima hari
(Sumber : Koleksi pribadi)

c. Perbanyak Kultur Jamur

Proses perbanyak kultur dimaksudkan untuk mendapatkan kultur jamur usia empat hari yang akan digunakan dalam penelitian. Adapun cara yang dilakukannya ialah dengan menggunakan pelubang gabus ukuran 0,06 mm pada biakan jamur dalam cawan Petri, potongan jamur tersebut kemudian diinokulasikan pada medium PSA miring dalam tabung reaksi (Gambar 3.2.a) selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama empat hari (Gambar 3.2.b)



Gambar 3.2 (a) potongan miselium pada medium PSA miring dan (b) biakan jamur *F. oxysporum* yang berusia 4 hari (Sumber : koleksi pribadi)

d. Identifikasi Rimpang Kunyit

Untuk memastikan bahwa spesies yang digunakan dalam penelitian ini adalah *C. domestica* Val. maka terlebih dahulu dilakukan identifikasi rimpang kunyit. Rimpang kunyit diamati bentuk morfologi dan warnanya.

e. Ekstraksi Rimpang Kunyit

Rimpang kunyit yang akan digunakan sebagai simplisia dibersihkan dengan mencucinya menggunakan air keran, kemudian dipotong-potong dan dikeringkan pada tempat yang tidak langsung terkena sinar matahari dengan cara diangin-anginkan supaya terdapat sirkulasi udara yang baik. Pengeringan ini bertujuan untuk memperoleh bahan tumbuhan yang tidak mudah rusak. Proses pengeringan selesai apabila rimpang telah kering, selanjutnya rimpang dihancurkan dengan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk

yang siap untuk diekstraksi (Gambar 3.3). Serbuk rimpang kunyit kemudian dimaserasi (direndam) dengan etanol 96% yaitu 200 g/1000 ml (Balbi-Pena *et al.*, 2006), kemudian diaduk dan dishaker minimal 24 jam. Simplisia yang telah direndam selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No 1. Ekstrak etanol rimpang kunyit selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 50°C, kemudian diuapkan dengan *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut etanol. Ekstrak yang sudah diuapkan pelarutnya dan berbentuk pasta disimpan pada botol gelap pada suhu 4°C.



Gambar 3.3 Serbuk Rimpang Kunyit
(Sumber : koleksi pribadi)

f. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dilarutkan dengan pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO) 1% untuk memperoleh konsentrasi ekstrak yang dikehendaki dalam perlakuan. Larutan yang telah diperoleh disimpan dalam botol kecil bertutup dan berwarna gelap.

3. Penelitian Utama

a. Uji Fitotoksik

Uji fitotoksik ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya efek fitotoksik ekstrak rimpang kunyit yang akan dipakai terhadap pertumbuhan tanaman cabai merah. Benih cabai merah direndam dalam ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 0,04%, 0,10%, 0,20%, 0,30% dan 0,40% dan 0,50% (b/v) selama 30 menit (Lestari, 2009). Sebagai kontrol positif benih direndam dalam fungisida Dithane M-45 0,2 % dan kontrol negatif dalam DMSO 1% serta akuades steril. Benih yang terlihat mengambang tidak dipergunakan untuk uji fitotoksik.

Benih yang telah direndam kemudian dipindahkan ke dalam polibag ukuran 30x25 cm yang telah berisi 1,5 kg tanah steril. Jumlah benih per polibag berisi lima benih. Selanjutnya dipelihara di rumah kaca selama tiga minggu untuk melihat ada tidaknya efek fitotoksik dari ekstrak terhadap perkecambahan dan pertumbuhan benih cabai. Konsentrasi ekstrak yang sudah menunjukkan gejala fitotoksik, tidak digunakan pada uji selanjutnya. Gejala fitotoksik yang diamati ialah nekrotik pada tepi, tengah dan ujung daun serta adanya warna perak (*bronzing*) dan kecoklatan (*browning*) pada ujung daun (Lestari, 2009) serta persentase perkecambahan (Spiegel dan Baumgarten, 2004).

b. Uji Daya Hambat Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) terhadap Jamur Patogen *Fusarium oxysporum*

1) Uji Hayati Pendahuluan

Untuk menentukan konsentrasi ekstrak paling efektif yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *F. oxysporum* secara *in vivo*, maka terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan ialah 0,04% ; 0,08% ; 0,12% ; 0,16% dan 0,2% (Astuti, 2009).

Tahap pertama dalam inokulasi ialah pembuatan suspensi spora dari biakan jamur dalam medium PSA miring yang berusia empat hari, yaitu dengan cara melarutkan garam fisiologis (NaCl 0,85%) ke dalam tabung reaksi yang berisi biakan jamur *F.oxysporum*. Dengan menggunakan jarum ose, spora dilepaskan dengan cara menggosoknya secara perlahan sehingga diperoleh suspensi spora. Kemudian suspensi spora yang diperoleh dihomogenkan dengan menggunakan *vorteks* dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi kosong yang steril. Suspensi spora selanjutnya dipipet dan ditetaskan satu tetes pada *haemocytometer*, lalu dihitung sampai mendapatkan konidia dengan kerapatan 10^6 spora/ml (Hassanein *et al.*, 2008). Selanjutnya 250 ml suspensi konidia yang diperoleh kemudian dicampurkan ke dalam 2 kg tanah steril (Taufik, 2004). Polibag yang akan digunakan terlebih dahulu direndam dalam larutan sodium hipoklorit selama semalam kemudian dibilas dengan akuades steril (Remadi *et al.*, 2006). Inokulasi dilakukan

lima hari sebelum benih cabai ditanam, hal ini untuk memastikan bahwa spora jamur telah berkembang pada medium tanah tersebut (Hassanein *et al.*, 2008).

Benih cabai merah direndam dalam ekstrak rimpang kunyit sesuai dengan konsentrasi 0,04% ; 0,08% ; 0,12% ; 0,16% dan 0,2% selama 30 menit, sebagai kontrol positif benih direndam dalam fungisida Dithane M-45 0,2 % selama 30 menit dan kontrol negatif dalam DMSO 1% serta akuades steril selama 30 menit (Taufik, 2004 ; Suwitchayanon dan Kunasakdakul, 2009)

Benih yang telah direndam kemudian dipindahkan ke dalam polibag dengan ukuran 30 x 25 cm yang telah berisi tanah steril 2/3 bagian dan sisanya tanah yang telah diinokulasi jamur *F.oxysporum* yaitu sebanyak 150 gram tanah untuk setiap polibag. Setiap polibag berisi lima benih cabai merah. Selanjutnya dipelihara di rumah kaca dan diamati perkecambahan, kejadian penyakit, keparahan penyakit dan kematian tanaman selama tiga minggu (Taufik, 2004).

Pada uji hayati pendahuluan, konsentrasi ekstrak yang digunakan mempunyai rentang yang cukup jauh. Konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *F. oxysporum* secara *in vivo* pada uji hayati pendahuluan akan diperkecil lagi rentangnya untuk digunakan pada uji hayati pokok sehingga akan

didapatkan konsentrasi paling efektif untuk menghambat pertumbuhan jamur *F. oxysporum* secara *in vivo*.

2) Uji Hayati Pokok

Data yang diperoleh dari hasil uji hayati pendahuluan merupakan patokan untuk menentukan konsentrasi yang digunakan pada uji hayati pokok. Berdasarkan hasil uji hayati pendahuluan, maka konsentrasi yang digunakan pada uji hayati pokok ialah 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10% dan 0,12%. Untuk kontrol negatif digunakan akuades steril dan DMSO 1%, sedangkan kontrol positif digunakan Dithane-M 45 0,2%.

3) Isolasi dan Identifikasi Jamur *F. oxysporum* dari Tanaman yang Terinfeksi

Untuk mengetahui apakah jamur yang menginfeksi tanaman ialah benar-benar jamur *F.oxysporum* maka dilakukan isolasi dari jaringan tanaman yang terinfeksi. Teknik isolasi yang dilakukan berdasarkan metode dari Agrios (1997).

Batang atau tangkai tanaman yang terinfeksi dipotong sekitar 2-4 cm, kemudian disterilkan potongan tanaman tersebut dengan cara direndam dalam Bayclin (mengandung NaOCl 5,25%) 10% selama tiga menit, setelah potongan tanaman disterilkan kemudian dikeringkan dengan menggunakan kertas hisap. Selanjutnya potongan tanaman direndam dalam akuades steril selama 2 - 3 menit untuk menghilangkan sisa NaOCl pada jaringan tanaman.

Lalu dengan metode aseptik disimpan 2-3 potongan tanaman dengan ukuran 2-4 mm pada medium PSA, kemudian diinkubasikan selama 7-14 hari. Setelah terlihat adanya pertumbuhan, potongan miselum kemudian dipindahkan ke dalam medium PSA yang baru kemudian jamur diidentifikasi dengan menggunakan metode *slide culture* seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.

4. Analisis Data

- a. Untuk mengukur persentase jumlah perkecambahan dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$JP = \frac{n}{N} \times 100 \%$$

Keterangan :

- JP : Jumlah perkecambahan
 n : Jumlah tanaman yang berkecambah
 N : Jumlah tanaman keseluruhan

- b. Persentase kejadian penyakit (*Disease incidence*) yaitu proporsi tanaman yang terkena penyakit dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Sinaga, 2003) :

$$KP = \frac{n}{N} \times 100 \%$$

Keterangan :

- KP : Kejadian penyakit

n : Jumlah tanaman yang terserang
 N : Jumlah tanaman keseluruhan

c. Keparahan penyakit (*disease severity*) dapat dihitung dengan menggunakan skoring sebagai berikut (Kerkeni *et al.*, 2007) :

0 = Tanaman tidak terserang penyakit sama sekali
 1 = Tanaman agak terserang penyakit (< 50 % daun layu)
 2 = Tanaman terserang dengan parah (> 50 % daun layu)
 3 = Tanaman mati

Rumus keparahan penyakit yang digunakan sebagai berikut (Sinaga, 2003) :

$$P = \frac{\Sigma(n \times v)}{N \times V} \times 100 \%$$

Keterangan :

P : Keparahan penyakit (%)
 n : Jumlah tanaman tiap kategori serangan
 v : Nilai skala setiap kategori
 N : Jumlah tanaman keseluruhan
 V : Nilai skala tertinggi

d. Persentase kematian tanaman dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$K = \frac{n}{N} \times 100 \%$$

Keterangan :

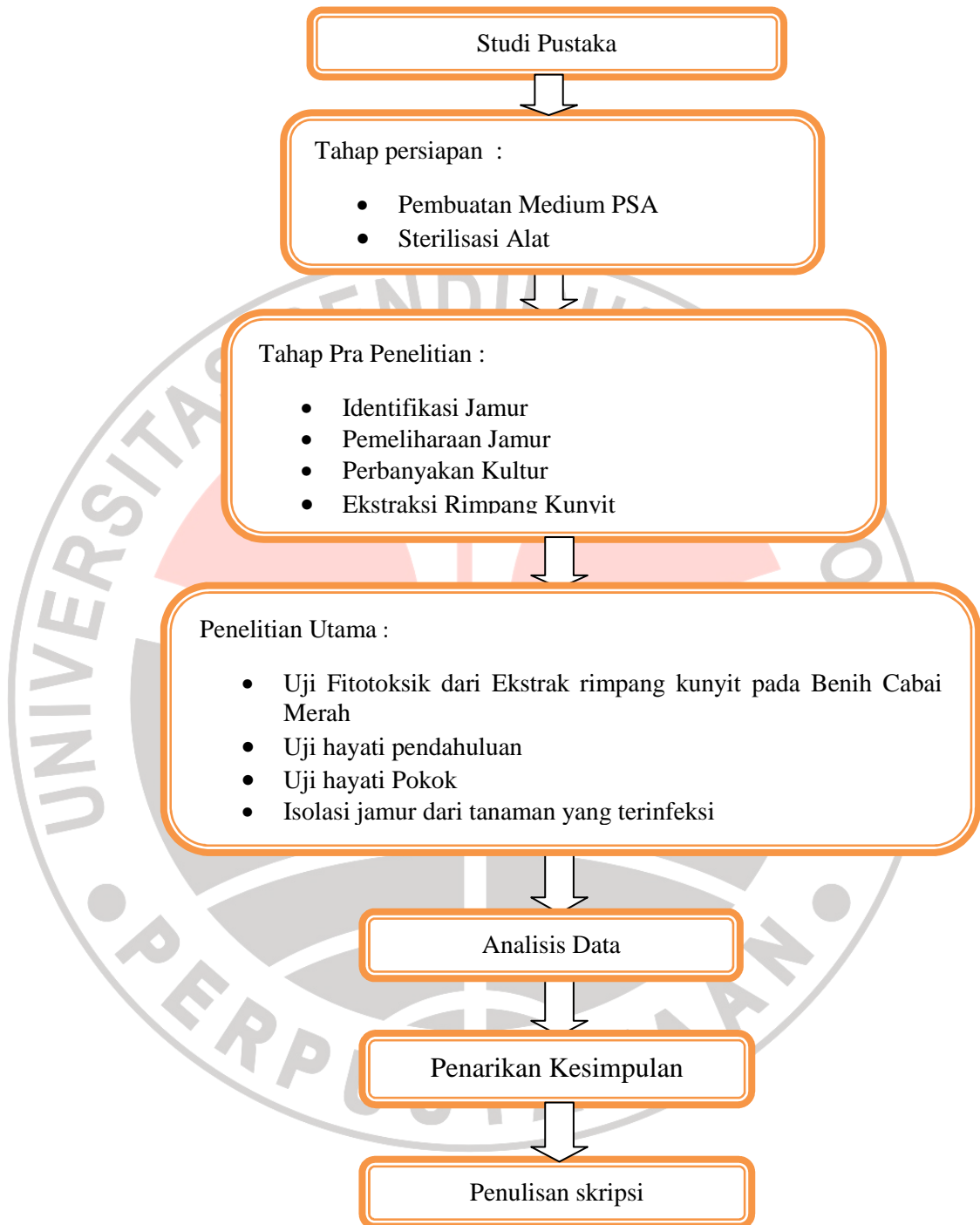
K : Persentase kematian
 n : Jumlah tanaman yang mati
 N : Jumlah tanaman keseluruhan

Data yang diperoleh berupa rata-rata benih yang tumbuh, kejadian penyakit, keparahan penyakit serta kematian tanaman dianalisis

dengan menggunakan program SPSS versi 16.0 *for windows*, dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Apabila data normal dan homogen dilakukan uji ANOVA, apabila data normal dan tidak homogen maka dilakukan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* untuk menguji hipotesis. Perbandingan nilai tengah antar perlakuan yang berpengaruh nyata dilakukan dengan uji jarak berganda Duncan $\alpha=0,05$.



G. Alur Penelitian



Gambar 3.4 Bagan Alir Penelitian